

Prevalência de *Cryptosporidium* sp. em cães de instituições da cidade de São Paulo

Prevalence of *Cryptosporidium* sp. in institutionalized dogs in the city of São Paulo, Brazil

Maria Anete Lallo e Eduardo Fernandes Bondan

Curso de Medicina Veterinária. Universidade Paulista. São Paulo, SP, Brasil

Descritores

Cryptosporidium, isolamento & purificação. Prevalência. Cães. Fezes, parasitologia. Reação em cadeia da polimerase.

Keywords

Cryptosporidium, isolation & purification. Prevalence. Dogs. Feces, parasitology. Polymerase chain reaction

Resumo

Objetivo

Os cães são importante fonte de infecção da criptosporidiose para o homem. O objetivo do estudo foi avaliar a ocorrência de *Cryptosporidium* sp. em cães e, adicionalmente, comparar duas técnicas de análise fecal.

Métodos

Foram analisadas 450 amostras fecais de cães na cidade de São Paulo entre 2003 e 2004. Os espécimes fecais foram randomicamente selecionados: 200 amostras de cães provenientes de um hospital veterinário universitário público (grupo 1) e 250 amostras de canis particulares (grupo 2). A pesquisa de *Cryptosporidium* sp. foi realizada empregando-se a coloração de Ziehl-Neelsen modificada e a técnica de PCR. Foi empregado o teste de duas proporções com intervalo de confiança de 0,05 (z crítico= $\pm 1,645$).

Resultados

Foram encontrados somente oocistos de *Cryptosporidium parvum*. A prevalência observada pela microscopia de luz foi de 8,8% e com a técnica de PCR foi de 9,5%. Os animais jovens apresentaram menor frequência (5,5%) em relação aos adultos (10,1%) e não se observou diferença estatisticamente significativa na prevalência entre machos e fêmeas.

Conclusões

A prevalência de *C. parvum* na população canina estudada foi semelhante às observadas em outros estudos e acometendo em igual proporção machos e fêmeas. A técnica de PCR permitiu a detecção de um número maior de casos positivos que a microscopia de luz.

Abstract

Objective

Dogs play an important role as infection source of human cryptosporidiosis. The objective of the study was to determine the prevalence of *Cryptosporidium* sp. in dogs as well as to compare two techniques of fecal analysis.

Methods

Four-hundred and fifty canine fecal samples from the city of São Paulo were analyzed between 2003 and 2004. Fecal samples were randomly selected from dogs housed in a university veterinary hospital (group 1, n=200) and private kennels (group 2,

Correspondência/ Correspondence:

Maria Anete Lallo
Rua Caconde, 125 Apto 51
01425-011 São Paulo, SP, Brasil
E-mail: bondan@uol.com.br

Recebido em 28/6/2004. Reapresentado em 16/3/2005. Aprovado em 5/8/2005.

n=250). The detection of Cryptosporidium was performed using modified Ziehl-Neelsen staining and Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. Statistical analysis was performed using the two-tailed test of significance at 5% confidence interval ($z_{critical}=\pm 1.645$).

Results

Only Cryptosporidium parvum oocysts were found. The prevalences found by light microscopy examination and PCR techniques were 8.8% and 9.5%, respectively. Young animals showed a lower frequency (5.5%) compared to adults (10.1%). There was no statistically significant difference in Cryptosporidium prevalence between males and females.

Conclusions

The prevalence of C. parvum in the canine population studied was similar to that one found in the literature and affects equally males and females. The use of PCR allowed the detection of more positive cases than light microscopy.

INTRODUÇÃO

O *Cryptosporidium* é um protozoário de distribuição cosmopolita sendo encontrado em uma ampla variedade de espécies animais.⁴ A criptosporidiose humana tem sido descrita desde 1976 em mais 90 países dos cinco continentes, na forma de casos individuais ou surtos populacionais decorrentes da ingestão de alimentos ou água contaminada por oocistos.⁸ O parasita tem-se destacado entre os principais enteropatógenos causadores de diarreia, inclusive nos pacientes com Aids, nos transplantados, nos submetidos à quimioterapia ou nos com doenças infecciosas imunossupressivas.⁵

O gênero *Cryptosporidium* é classificado como um eucarionte pertencente ao filo Apicomplexa.¹³ Todas as espécies de *Cryptosporidium* são parasitas intracelulares obrigatórios que sofrem desenvolvimento endógeno, culminando na produção de oocistos eliminados nas fezes.¹⁶

Dez espécies de *Cryptosporidium* são consideradas válidas e apenas o *C. parvum* tem sido descrito como causador de infecção no homem e nos outros animais. No entanto, evidências moleculares mostram que o *C. parvum* não é uma espécie uniforme, mas consiste em variadas e distintas espécies genotípicas.⁹ Até recentemente, a criptosporidiose humana era atribuída somente aos genótipos humanos e bovinos, os últimos responsabilizados pelas infecções zoonóticas. Atualmente, considera-se que outras espécies como o *C. felis* e o *C. meleagridis*,³ assim como outros genótipos, como o proveniente do cão,^{10,17} podem ser causadores da infecção no homem.

Os animais de estimação, em especial cães e gatos, representam significantes benefícios para as pessoas e para a sociedade. Eles contribuem com o desenvol-

vimento físico, social e emocional das crianças e com o bem-estar de seus proprietários, em particular de idosos.¹⁸ No entanto, animais de companhia podem constituir importante fonte de infecção para o homem, determinando doenças genericamente denominadas zoonoses, como a criptosporidiose.⁶

Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a prevalência de *Cryptosporidium* em cães, considerando-se que a criptosporidiose é uma zoonose na qual cão pode desempenhar papel epidemiológico importante. Adicionalmente, compararam-se dois métodos de diagnóstico.

MÉTODOS

O estudo foi realizado no município de São Paulo, entre 2003 e 2004. Foram analisadas 450 amostras de fezes de cães provenientes de um hospital veterinário universitário público (grupo 1, $n=200$) e de canis particulares (grupo 2, $n=250$).

As amostras fecais foram randomicamente selecionadas. No grupo 1, os espécimes fecais foram retirados, por sorteio, daqueles recebidos pelo laboratório de análises clínicas do hospital veterinário para exame parasitológico de rotina. Os animais do grupo 2 eram mantidos individualmente em canis cimentados, com solário, e alimentação consistindo de ração comercial seca. Em todos os canis, as condições de criação e higiênicossanitárias eram adequadas, não havendo diferenças importantes entre os mesmos. Os animais que integraram a amostra foram numerados e sorteados.

Todas as amostras foram submetidas aos dois exames. As amostras de fezes foram mantidas em frascos de plástico, identificadas e transportadas sob refrigeração até o laboratório para análise, que foi realizada num período máximo de 24 horas.

Um grama de cada amostra de fezes foi diluído em solução tampão PBS, filtrado e colocado em tubo plástico com capacidade de 15 ml. O filtrado foi centrifugado a 750 x g por 5 min e o sobrenadante, descartado. Ao sedimento foi adicionada solução de sacarose saturada com gravidade específica de 1,2 e repetiu-se a centrifugação sob as mesmas condições. O sobrenadante, coletado com auxílio de uma alça bacteriológica de platina com diâmetro de 7 mm, foi disposto sobre lâmina de vidro. Após a secagem e fixação com metanol, procedeu-se à coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada.¹² As lâminas coradas foram observadas em microscópio de luz com aumentos de 100, 400 e 1.000 vezes. Os oocistos de *Cryptosporidium* foram medidos com ocular micrométrica, utilizando-se o aumento de 400 e 1.000 vezes. Os oocistos de *C. parvum* apresentam diâmetro variando de 4 a 5 µm e formato esférico a ovalado segundo Levine¹³ (1980).

Para a realização da reação de polimerização em cadeia (PCR) foi utilizado um grama de cada amostra fecal. Procedeu-se da mesma forma que para a coloração. O sobrenadante foi removido com alça de platina para tubos plásticos com capacidade de 2 ml, adicionado de PBS e centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o sedimento diluído com 200 µl de PBS, fervido a 100°C por 5 min e centrifugado novamente. O sobrenadante foi então purificado utilizando-se o mini kit QIAampDNA (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha). A região 18S do RNAr do gene de *Cryptosporidium parvum* inclui uma região variável usada para distinguir espécies de *Cryptosporidium* e foi amplificada utilizando-se os *primers* 18SiF (5'-AGTGACAAGAAATAACAATACAGG-3') e 18SiR (5'-CCTGCTTTAAGCACTCTAATTTTC-3') conforme previamente descrito.¹⁴

A amplificação foi realizada em tubos com capacidade de 500 µl, contendo 10 µl de tampão de reação (KCl 500 mM, MgCl₂ 15mM, Tris-HCl 100 mM - pH 9,0), 0,8 µl de dNTP *mix* (200 µM de cada oligonucleotídeo - dCTP, dATP, dGTP, dTTP), 25 pmol de cada *primer*, 10 l da amostra de DNA e água q.s.p., num volume final de 100 µl.

Sobre o conteúdo de cada tubo de reação foram adicionadas três gotas de óleo mineral para evitar evaporação. As reações foram realizadas em termociclador modelo TC-480 (Perkin Elmer Corporation, Foster City, CA, USA). Após desnaturação inicial a 94°C por 10 min, as amostras foram resfriadas subitamente em gelo, acrescentando-se a cada tubo 2,5 UI de *Taq* DNA polimerase.

A amplificação de DNA foi realizada em 35 ciclos:

desnaturação a 94°C por 60 seg, hibridização dos *primers* a 55°C por 60 seg e extensão a 72°C por 90 seg. Completado o último ciclo, as amostras foram mantidas a 72°C por 10 min e armazenadas a 4°C. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, usando-se solução tampão TBE por aproximadamente 30 min (80V). Os géis foram corados em solução de 5 g/ml de brometo de etídio por 5 min e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta. As documentações foram feitas em filme para fotografia instantânea.

A análise estatística foi realizada empregando-se o teste de duas proporções com intervalo de confiança de 0,05 (z crítico=±1,645).

RESULTADOS

Dos animais analisados, 194 (43,1%) eram machos e 256 (56,9%) eram fêmeas. Com relação à faixa etária, observou-se que 54 (12%) animais eram jovens apresentando idade inferior ou igual a 12 meses, e o restante (88%) eram adultos. Apenas 10 animais considerados jovens apresentavam menos do que seis meses de idade: sete eram provenientes de cães e três do hospital veterinário. Foram encontradas diferentes raças de cães, entre elas Poodle, Pastor Alemão, Boxer, Beagle, Weimaraner, Rottweiler entre outras.

Por meio da microscopia de luz, os oocistos de *C. parvum* foram observados nas fezes de 40 (8,8%) cães. O gene que codifica a região 18S rRNA do *C. parvum* além de ser amplificado nas 40 amostras positivas pela microscopia de luz, também foi amplificado em mais três amostras de fezes de cães negativas pela microscopia de luz. Consequentemente, a prevalência da infecção pelo *C. parvum* na cidade de São Paulo foi de 9,5% (43/450) baseada no resultado da PCR. Observou-se diferença estatisticamente significativa na prevalência de criptosporidiose empregando-se os dois métodos de diagnóstico, sendo a técnica de PCR mais eficaz que a coloração ($\alpha=0,05$).

Por grupo, as prevalências encontradas foram 11,5% (23/200) para o grupo 1, e 8% (20/250) para o grupo 2 (Tabela).

Houve distribuição uniforme de amostras positivas para *C. parvum* entre os animais de ambos os sexos. Pela técnica de PCR, 24 fêmeas (9,4%) e 19 machos (9,8%) foram considerados positivos para o protozoário (Tabela). Não se observou diferença estatisticamente significativa na prevalência de criptosporidiose entre machos e fêmeas ($\alpha=0,05$).

Entre os animais jovens, 5,5% (3/54) foram positi-

Tabela - Distribuição das prevalências de *Cryptosporidium parvum* de acordo com o grupo, a idade e o sexo dos animais estudados por microscopia de luz ou por PCR.

Variáveis	Animais	Positivos pela	
	N	Microscopia de luz N (%)	PCR N (%)
Grupo 1	200	20 (10,0)	23 (11,5)
Grupo 2	250	20 (8,0)	20 (8,0)
Total	450	40 (8,8)	43 (9,5)
Jovens (idade ≤12 meses)	54	3 (5,5)	3* (5,5)
Adultos (idade >12 meses)	396	37 (9,3)	40* (10,1)
Machos	194	18 (9,3)	19** (9,8)
Fêmeas	256	22 (8,6)	24** (9,4)

Grupo 1: Hospital veterinário; Grupo 2: Canis particulares

*Houve diferença significativa ($\alpha=0,05$, z crítico=1,645), pelo teste de duas proporções

**Não houve diferença significativa ($\alpha=0,05$, z crítico=1,645), pelo teste de duas proporções

vos para *C. parvum*, já nas fezes de cães adultos, a percentagem de positivos foi de 10,1% (40/396) (Tabela). As amostras dos animais jovens positivas para o protozoário eram do grupo 1. Houve diferença estatisticamente significativa entre jovens e adultos ($\alpha=0,05$).

Não houve diferença estatisticamente significativa nas prevalências de *C. parvum* nas raças de cães.

DISCUSSÃO

Os estudos de prevalência de *Cryptosporidium* em populações caninas têm revelado frequências variáveis. Augustin-Bichil et al² (1984), na Alemanha, e Simpson et al¹⁹ (1988), na Escócia, não observaram casos positivos para esta coccídia em 200 e 101 amostras fecais, respectivamente. Por outro lado, Newman et al¹⁵ (1993) no Brasil e Abe et al¹ (2002) no Japão observaram, respectivamente, prevalência de 10,2% e 9,3% nas populações caninas estudadas. Resultados semelhantes foram observados na presente investigação, na qual a prevalência total de *Cryptosporidium* foi de 9,5% pela técnica de PCR.

O diagnóstico de criptosporidiose pela microscopia de luz demanda tempo e experiência do investigador para identificar de maneira precisa os oocistos. Contudo, é impossível a distinção entre espécies e genótipos de *Cryptosporidium* pela microscopia de luz.¹⁶ No presente estudo, o diagnóstico da infecção baseou-se na microscopia de luz associada à técnica de PCR. Por meio da microscopia de luz, suspeitou-se que os oocistos observados eram de *C. parvum* pelas suas dimensões, sendo a confirmação feita pela técnica de PCR, pelo emprego de *primers* que amplificam uma região com 298 pares de bases obtida do gene 18S rRNA, específica para o *C. parvum*.¹⁴ A diferença, estatisticamente significativa, entre o diagnóstico pela microscopia de luz e a técnica de PCR reforça ainda mais a necessidade de implantação, nos laboratórios de diagnóstico, de ambas as técnicas.

Em geral, a eliminação de oocistos de *Cryptos-*

poridium é intermitente e sua quantidade variável, dependendo da fase do ciclo em que se encontra, assim como da suscetibilidade do hospedeiro à infecção.²² Portanto, é importante que técnicas de diagnóstico sensíveis sejam utilizadas nos casos em que há suspeita de criptosporidiose.

Estes resultados reforçam as evidências de que a sensibilidade no diagnóstico é ampliada pela técnica de PCR, a qual tem sido aplicada em larga escala para a identificação do agente em seres humanos, em suínos e em camundongos.⁹

Uma vez amplificado o DNA, seria necessário o sequenciamento gênico para identificar os genótipos de *C. parvum* envolvidos nas infecções observadas. Entretanto, isto não pôde ser realizado por problemas técnicos, impossibilitando conclusões a respeito do potencial epidemiológico dos cães positivos.

Fukushima & Helman¹¹ (1984), Sisk et al²⁰ (1984) e Turnwald et al²¹ (1988) observaram associação entre o *Cryptosporidium* sp. e outros processos patológicos, reforçando o fato de que qualquer condição debilitante pode tornar o animal mais suscetível a este agente oportunista. Os resultados do presente estudo colaboram para esta suposição já que um maior número de animais positivos para *C. parvum* (11,5%) foi registrado no grupo de cães atendidos no hospital veterinário, não sendo relacionados, contudo, os motivos pelos quais as consultas foram realizadas.

Assim como para outras coccídias, as condições ambientais e a presença de animais infectados e a aglomeração ou superlotação de espaços físicos podem favorecer a disseminação dos parasitas numa dada população. Nos canis, observou-se menor prevalência do protozoário, o que pode ser compreendido como fruto de um manejo apropriado. Nesses ambientes, as condições higiênico-sanitárias eram rigorosas, evitava-se a superpopulação e o tratamento antiparasitário era realizado com frequência, evitando-se infecções concomitantes.

Diversos autores têm relatado altas taxas de prevalência de criptosporidiose em animais jovens da maioria das espécies, assim como sintomatologia clínica mais severa.^{16,19} Os mecanismos envolvidos com a maior suscetibilidade dos cães jovens não são compreendidos, tendo sido a mesma atribuída à presença de infecções concomitantes e à imaturidade de seu sistema imune. Dubey et al⁷ (1990) observaram maior prevalência em animais com idade igual ou inferior a seis meses do que em animais adultos. Na presente investigação, maior positividade foi observada nos animais adultos em relação aos jovens, discordando dos resultados obtidos pelos autores acima referidos. Uma vez que a amostragem foi feita aleatoriamente, o número de animais jovens com idade igual ou inferior a seis meses foi pequeno, apenas 10 cães, e entre estes, três provinham do hospital veterinário e os outros, de canis. Como foi anteriormente referido, as condições de criação nos canis eram bastante satisfatórias e uniformes, sendo os animais jovens mantidos em local separado dos adultos. Desta forma, a disseminação do protozoário e a sua incidência poderiam ficar mais controladas, tal como foi observado. Alguns autores^{11,20,21} descreveram criptosporidiose em filho-

tes com infecções virais concomitantes. Embora a prevalência geral do protozoário nos animais jovens tenha sido menor, ela ocorreu nos animais provenientes do hospital e, portanto, portadores de algum estado mórbido. Esse achado reforça a evidência de que outros fatores, não somente a resposta imune, podem estar associados com a prevalência de *Cryptosporidium* sp. em cães jovens.

Com relação ao sexo, não houve diferença quanto ao número de casos positivos entre machos e fêmeas, concordando com os achados de El Ahraf et al⁸ (1991), que não observaram qualquer predisposição sexual em 200 cães pesquisados. Outro fator que também não interferiu na prevalência do protozoário foi a raça dos cães incluídos na pesquisa. Este achado corrobora resultados semelhantes observados por outros autores.^{8,19}

A prevalência de *C. parvum* na população canina estudada foi semelhante às observadas em outros estudos e acometendo igual proporção de machos e de fêmeas. O diagnóstico foi otimizado com a técnica de PCR, a qual permitiu a detecção de um número maior de casos positivos (9,5%) do que a microscopia de luz (8,8%).

REFERÊNCIAS

1. Abe N, Kimata I, Iseki M. Identification of genotypes of *Cryptosporidium parvum* isolates from a patient and dog in Japan. *J Vet Med Sci* 2002;64(2):165-8.
2. Augustin-Bichil VG, Boch J, Henkel G. Kryptosporidien-infektionen bei hund und katze. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1984;97(5):179-81.
3. Chacin-Bonilla L. Importance of the different species and genotypes of *Cryptosporidium* in public health. *Invest Clin* 2001;43(3):215.
4. Current WL. Human cryptosporidiosis. *N Engl J Med* 1983;309:614-5.
5. Current WL, Reese NC, Ernest JV, Bailey WS, Heyman MB, Weinstein WM. Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. *N Engl J Med* 1983;308(21):1252-7.
6. Dohoo IR, McDonnell WN, Rhodes CS, Elazhary YL. Veterinary research and human health. *Can Vet J* 1998;39(9):548-56.
7. Dubey JP, Speer CA, Fayer R. *Cryptosporidiosis of man and animals*. Boston (MA): CRC; 1990.
8. El-Ahraf A, Tacal JV, Sobih M, Amin M, Lawrence W, Wilcke BW. Prevalence of cryptosporidiosis in a dog and a human being in San Bernardino country, California. *J Am Vet Med Assoc* 1991;198(4):631-4.
9. Fayer R, Morgan UM, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol* 2000;30(12-13):1305-22.
10. Fayer R, Trout JM, Xiao L, Morgan UM, Lal AA, Dubey JP. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J Parasitol* 2001;87(6):1415-22.
11. Fukushima K, Helman RG. Cryptosporidiosis in a pup with distemper. *Vet Pathol* 1984;21(2):247-8.
12. Garcia LS, Bruckner DA. *Diagnostic medical parasitology*. New York (NY): Elsevier; 1988.
13. Levine ND. Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa). *J Protozool* 1984;31(1):94-8.
14. Morgan UM, Constantine CC, Forbes DA, Thompson RCA. Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rDNA sequencing and direct PCR analysis. *J Parasitol* 1997;83(5):825-30.
15. Newman RD, Wuhib T, Lima AA, Guerrant RL, Sears CL. Environmental sources of *Cryptosporidium* in an urban slum in northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1993;49(2):270-5.
16. O'Donoghue PJ. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int J Parasitol* 1995;25(2):139-95.

17. Pedraza-Díaz S, Amar C, Iversen AM, Stanley PJ, McLauchlin J. Unusual cryptosporidium species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* dog type from patients in England. *J Med Microbiol* 2001;50(3):293-6.
18. Robertson ID, Irwin PJ, Lymbery AJ, Thompson RCA. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. *Int J Parasitol* 2000;30(12-13):1369-77.
19. Simpson JW, Burnie AG, Miles RS, Scott JL, Lindsay DI. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* infection in dogs from Edinburgh. *Vet Rec* 1988;123(17):445.
20. Sisk DB, Gosser HS, Styer EL, Branch LO. Intestinal cryptosporidiosis in two pups. *J Am Vet Med Assoc* 1984;184(7):835-6.
21. Turnwald GH, Barta O, Taylor HW, Kreeger J, Coleman SU, Pourciau SS. Cryptosporidiosis associated with immunosuppression attributable to distemper in a pup. *J Am Vet Med Assoc* 1988;192(1):79-81.
22. Tzipori S. Cryptosporidiosis in perspective. *Adv Parasitol* 1988;27:63-129.